

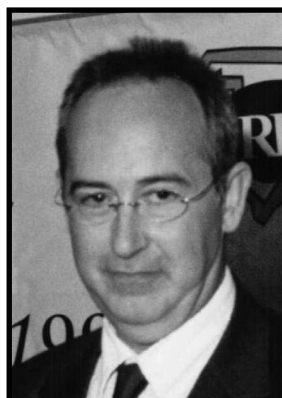
PRESENTE Y FUTURO DE LA TERAPIA GÉNICA DE LA RETINOSIS PIGMENTARIA



José Martín Nieto

Profesor de Genética

Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología
Universidad de Alicante



Nicolás Cuenca Navarro

Profesor de Biología Celular

Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología
Universidad de Alicante

EN REALIDAD NO SE TRATA DE UNA ENFERMEDAD ÚNICA, SINO QUE SE CONOCE POR ESTE NOMBRE DESDE HACE CASI 150 AÑOS A UN CONJUNTO DE DEGENERACIONES HEREDITARIAS DE LA RETINA, MUY HETEROGÉNEAS TANTO EN SUS SÍNTOMAS Y EDAD DE APARICIÓN COMO EN SU BASE GENÉTICA. LOS FOTORRECEPTORES (ES DECIR, LAS CÉLULAS SENSORIALES DE LA RETINA RESPONSABLES DE CAPTAR LA LUZ Y ENVIAR SEÑALES ELÉCTRICAS AL CEREBRO) DEGENERAN PROGRESIVAMENTE Y MUEREN, PRIMERO LOS BASTONES Y MÁS TARDE LOS CONOS, DESEMBOCANDO EN CEGUERA PARCIAL O TOTAL.

EL ORIGEN GENÉTICO DE LA RP ES COMPLEJO. SE CONOCEN ACTUALMENTE 33 GENES (DE LOS APROX. 30.000 QUE CONTIENE EL GENOMA HUMANO) QUE PUEDEN PRODUCIR RP SI SUFREN MUTACIÓN (GONZÁLEZ-DUARTE, 2004), Y QUE SE HALLAN COMPILADOS EN LA BASE DE DATOS RETNET (2006). EXISTEN ADEMÁS EN CONJUNTO CIENTOS DE MUTACIONES CONOCIDAS. SIN EMBARGO, MÁS DE LA MITAD DE LOS CASOS DE RP NO TIENEN UNA CAUSA GENÉTICA CONOCIDA, POR LO QUE FALTAN AÚN MUCHOS GENES POR DESCUBRIR; SE ESTIMA QUE UN 60%.

¿Cuáles son los efectos de las mutaciones sobre los fotorreceptores o las células del epitelio pigmentario?

Dado el alto grado de diferenciación y complejidad de los conos y bastones existe una gran cantidad de proteínas susceptibles de sufrir alteraciones debido a mutaciones genéticas (Wang y cols., 2005). Algunas mutaciones actúan sobre proteínas involucradas en la cascada de la fototransducción, es decir, sobre las reacciones químicas que se producen en los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores para transformar el estímulo de la luz en una señal eléctrica. Un ejemplo es la rodopsina, cuya función es la absorción de la luz. Otras mutaciones actúan sobre la estructura de los fotorreceptores, por ejemplo las que afectan a las periferinas, que mantienen paralelos entre sí los discos membranosos de los fotorreceptores. También existen mutaciones que afectan al reciclado de los pigmentos visuales (rodopsina de bastones y opsinas de conos), o los mecanismos celulares de fabricación de las proteínas.

¿Que es una mutación genética?

Todas las células fabrican proteínas, las cuales forman parte estructural de las células o regulan su funcionamiento. Las instrucciones para fabricar estas proteínas se encuentran en el núcleo de la célula, almacenada en el ADN. Un gen es un fragmento de ADN que contiene la información necesaria para producir una proteína. Un gen se copia en moléculas de ARN para

llevar esta información fuera del núcleo hasta los ribosomas, donde se fabrican las proteínas. El ADN sería como el disco duro de un gran ordenador donde estarían almacenados todos los libros de una biblioteca. Si copiáramos la información de un libro en un 'compact disc' (CD), éste sería el ARN, la impresora sería el ribosoma y la impresión en papel del libro sería la proteína (Figura 1). Si se produce un error en el ADN (por ejemplo, un salto de una letra en el texto), lo que equivaldría a una mutación en el ordenador central, el ARN que se copiaría (CD) sería defectuoso. Se fabricaría el libro (proteína), pero no se podría leer pues las palabras no tendrían significado.

Cada célula contiene duplicada la información para la síntesis de cada proteína. Si una mutación se produce en una copia y la proteína mal fabricada actúa como si fuera un tóxico sobre la célula, la consideraríamos una mutación 'dominante'. Cuando es necesario que las dos copias estén mutadas para que la célula mueran, se denomina mutación 'recesiva'. La mayoría de los casos de RP presentan herencia recesiva, es decir, para manifestarse la ceguera se requiere haber heredado un gen mutado del padre y otro de la madre. En la gran mayoría de estas familias ambos progenitores son videntes, aunque puede existir algún antepasado afecto conocido. Sin embargo, no son infrecuentes los casos que presentan herencia dominante, es decir, basta con haber heredado un solo gen mutado, bien del padre o bien de la madre, para desarrollar la enfermedad. En estas familias uno de los dos

progenitores típicamente está afectado. Sin embargo, en una gran proporción de los casos de RP no existen datos familiares como para clasificarlos genéticamente.

Así, dependiendo del gen en que ocurra la mutación y en qué lugar concreto de ese gen, la enfermedad tendrá una mayor o menor gravedad, edad de aparición y rapidez de avance (Farrar y cols., 2002). Todo ello, salvo excepciones, es muy difícil de predecir por el médico (pronóstico), incluso conociendo la causa genética concreta. Muchas mutaciones son características de una familia en particular, mientras que otras surgieron hace miles de años y se han encontrado en personas de muy distintos países (Wang y cols., 2005). Se dispone actualmente de una gran variedad de animales de laboratorio que presentan las mismas mutaciones que personas con RP y sufren efectos similares. Sin embargo, el proceso de degeneración de la retina que en una persona ocurre a lo largo de varias décadas, en un ratón o rata tiene lugar en pocos meses. Estos 'animales modelo' de la RP no sólo son útiles para investigar cómo se desarrolla en el tiempo dicho proceso a nivel celular y molecular, sino también para el ensayo de nuevas terapias. Existen en la actualidad varias líneas de investigación encaminadas a la terapia de esta enfermedad (Cuenca, 2005). Por una parte, se están utilizando factores neurotróficos (como el bFGF, CNTF, BDNF, GDNF, etc.), ya sea inyectados o secretados por células genéticamente modificadas y posteriormente encapsuladas, para prevenir o ralentizar el proceso de

degeneración (Mayor Lorenzo, 2006). Otros investigadores están proponiendo la utilización de antioxidantes a la hora de ralentizar la muerte de los fotorreceptores. Asimismo, existen varios grupos que están ensayando el trasplante de células madre con el fin de sustituir los fotorreceptores degenerados por fotorreceptores sanos (Chong y Bird, 1999). Sin embargo la alternativa terapéutica por excelencia encaminada a la curación de la enfermedad en su base molecular sería la terapia génica.

¿En qué consiste la terapia génica?

La idea de la terapia génica es a priori sencilla. Si la célula posee un fragmento de ADN enfermo (gen mutado), sólo tendríamos que introducir un fragmento de ADN sano (gen correcto) para que se pueda fabricar la proteína sana. Es decir, introducir en el disco duro del ordenador la información adecuada para fabricar la proteína correcta (libro). A medida que se van conociendo nuevos genes y mutaciones que causan ceguera, se va aumentando el potencial de llevar a cabo terapia génica. Sin embargo, actualmente constituye un gran reto el introducir genes en los fotorreceptores de una persona, incluso de un animal de laboratorio. Existen problemas, como –entre otros– evitar su degradación una vez inyectados en el ojo, conseguir dirigirlos a los fotorreceptores, y que además funcionen durante un largo tiempo (Iborra, 2003). Sin embargo, sí resulta más factible introducirlos en el laboratorio en células madre retinianas, fotorreceptores o

células del RPE, extraídas del ojo de pacientes y cultivadas en placas de Petri. Para ello, el gen puede añadirse a las células: i) en forma de ADN con algunas modificaciones químicas, ii) en forma de complejos con vesículas de lípidos llamadas liposomas, iii) en el interior de microcápsulas de proteínas, o iv) encapsulado en 'nanopartículas' compuestas por un polímero de ácido poli-láctico o poli-glicólico, o por un co-polímero de ambos (Bejjani y cols., 2005), todo ello con el objeto de maximizar su eficacia de entrada en las células y hacerlo más estable en su interior (Marano y Rakoczy, 2005). Una vez modificadas genéticamente y cultivadas en grandes cantidades, estas células se inyectarían en el ojo del paciente, con lo cual se trataría de una terapia génica 'ex vivo' (Chong y Bird, 1999).

Terapia génica de la RP con herencia recesiva

Ya que en estas variantes de la enfermedad las dos copias del gen están alteradas, se trata de introducir en los fotorreceptores un trozo de ADN con la información del gen sano para que estas células produzcan la proteína correcta. La transferencia directa de genes a las células de la retina en un paciente o animal vivo (terapia génica 'in vivo') requiere el utilizar un vehículo, o vector. Se está trabajando en encapsular genes en el interior de los llamados 'inmunoliposomas', que son vesículas especiales de lípidos recubiertas por un anticuerpo cuya función es la de unirse a las células diana (en nuestro caso, los fotorreceptores) y promover la entrada del gen terapéutico en su interior

(Zhu y cols., 2002). La ventaja de los inmunoliposomas es que pueden ser inyectados de forma intravenosa, es decir, sin necesidad de ser administrados por vía intraocular. Sin embargo, suelen funcionar mejor con este propósito determinados virus, que no sólo son capaces de infectar con eficacia las células humanas o de animales de laboratorio, sino también de transportar ADN (o ARN) a su núcleo (disco duro del ordenador). Hasta la fecha, se han utilizado tres tipos de virus para "entregar" con éxito genes en la retina de animales modelo de RP: los llamados adenovirus, lentivirus y virus adeno-asociados, o AAV (Hauswirth y Lewin, 2000). A estos virus se les ha eliminado mediante ingeniería genética parte de su cromosoma, con el objeto de convertirlos en no patógenos, y en su lugar se inserta el gen a introducir en la retina. Estos virus "artificiales" se inyectan a continuación en el espacio subretinal, situado entre el epitelio pigmentario de la retina y los fotorreceptores, con la idea de que al infectar estos últimos les introduzcan el gen terapéutico. Cada uno de los tipos de virus mencionados tiene sus ventajas y sus inconvenientes, es decir, no existe un virus perfecto para llevar a cabo esta misión, pero los más prometedores hasta la fecha están siendo los AAV (Surace y Auricchio, 2003; Hauswirth y cols., 2004). Se han obtenido, así, algunos éxitos destacables en animales. Por ejemplo, el gen de la periferina se ha introducido utilizando virus AAV como vehículo en la retina, ya en fase de degeneración, de ratones mutantes en dicho gen. Con ello se ha conseguido restaurar tanto la estruc-

tura como la función de los fotorreceptores, esta última evaluada mediante electroretinograma (Ali y cols., 2000). Estos virus también han demostrado ser efectivos a la hora de introducir el gen del CNTF en ratones (Liang y cols., 2001), o del GDNF en ratas (McGee Sanftner y cols., 2001), mutantes en el gen de la rodopsina, obteniéndose una supervivencia prolongada de los fotorreceptores y una mejora de los electroretinogramas. Uno de los mayores éxitos obtenidos hasta la fecha ha sido la recuperación de las funciones visuales en perros mutantes con ceguera congénita mediante la introducción del gen RPE65 en el epitelio pigmentario utilizando AAV como vectores (Acland y cols., 2005), estudios que se encuentran actualmente en fase I de experimentación clínica (Mayor Lorenzo, 2006). Efectos neuroprotectores también se han conseguido utilizando lentivirus o adenovirus para introducir el gen PDE6B en ratones

mutantes con distrofia retiniana (Takahashi, 2004).

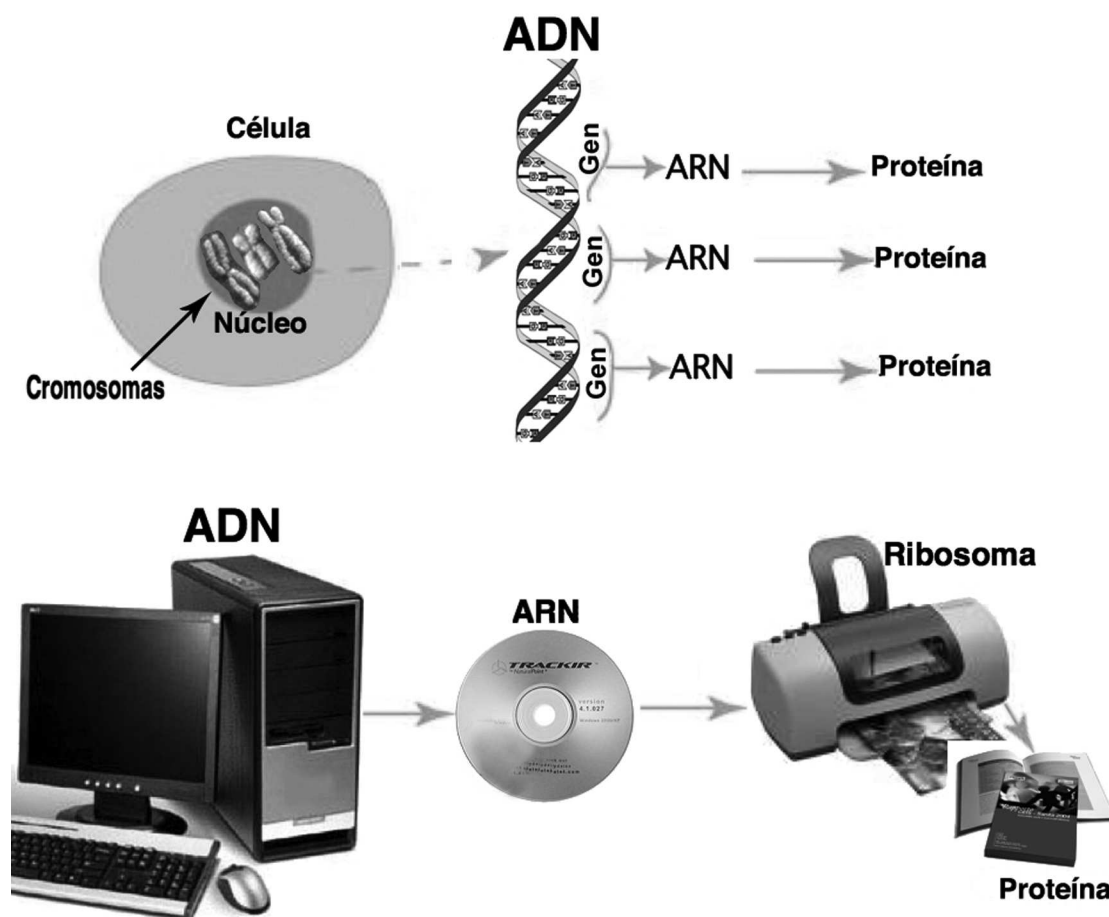
Terapia génica de la RP con herencia dominante

En los casos de RP dominante, ocurre que la proteína anómala producida a partir de la información errónea contenida en el gen mutado es tóxica, se acumula y mata al fotorreceptor. En este caso, no sirve el introducir en la retina la versión correcta del gen, ya que la versión incorrecta de la proteína sigue produciéndose. Tampoco es posible hoy día eliminar el gen mutado ni sustituirlo en la célula por la versión correcta, ni siquiera en animales de laboratorio. En su lugar, la terapia génica en este caso consistiría en 'silenciar' el gen incorrecto, es decir inactivarlo, de forma que no se produzca la proteína mutante. Para ello se emplean ADN o ARN como agentes terapéuticos.

a) Oligonucleótidos antisentido

En primer lugar, pueden utilizarse moléculas cortas de ADN o ARN, denominadas 'oligonucleótidos antisentido' (Marano y Rakoczy, 2005), que poseen una secuencia complementaria a la de un trozo del gen que se pretende silenciar, la cual le permite unirse a éste. Una analogía evidente sería la de las dos manos: la izquierda es complementaria de la derecha y puede unirse a ella. Los oligonucleótidos de ADN antisentido poseen la capacidad de unirse a su correspondiente gen dentro del núcleo de la célula, impidiendo que se copie en ARN. Es decir, se unirían al disco duro del ordenador (ADN) e impedirían que la información se copiase en un CD (ARN), con lo que no se podría fabricar la proteína incorrecta.

Los oligonucleótidos de ARN antisentido, por otro lado, se unen al ARN que se copia del ADN, evitando su lectura por los ribosomas y, con ello, la produc-



ción de la proteína. Es decir, sería como un trozo de cinta adhesiva que se pegaría al CD (ARN) y no dejaría que la impresora (ribosoma) fabricara el libro (proteína).

Para diseñar estos oligonucleótidos es preciso conocer cuál es el gen concreto mutado en cada persona. Un cierto problema lo constituye el hecho de que estos ADN o ARN cortos no distinguen entre el gen o el ARN correcto y el mutante, por lo que se evitaría la producción de ambas proteínas. Sin embargo, el silenciamiento génico nunca se consigue al 100%.

b) Ribozimas

Otra técnica para poder silenciar los genes incorrectos consiste en la utilización de las herramientas diseñadas mediante ingeniería genética denominadas ribozimas (Hauswirth y Lewin, 2000). Éstas son moléculas de ARN con propiedades enzimáticas: poseen la capacidad de unirse al ARN de un gen (CD) y, a continuación, funcionar a modo de tijeras y cortarlo, es decir, destruirlo. Se están diseñando ribozimas que son capaces de distinguir entre el ARN normal y el mutante, de forma que se unan y degraden ('supriman') sólo a este último (Farrar y cols., 2002). Así, dejaría de generarse en la célula la proteína mutante tóxica, pero seguiría produciéndose la proteína normal, con lo cual aquélla sobreviviría. Cabe destacar aquí que se ha conseguido evitar la muerte de los fotorreceptores en ratas portadoras de la mutación P23H utilizando ribozimas, introducidos utilizando AAV como vectores, los cuales destruyen selecti-

vamente la versión mutante del ARN de la rodopsina y no la versión correcta (Hauswirth y Lewin, 2000; LaVail y cols., 2000).

c) ARN de interferencia

Una tercera estrategia que se está ensayando para silenciar genes está basada en el fenómeno denominado 'interferencia por ARN' (descrito en 1998 por Craig Mello y Andrew Fire, recién galardonados con el Premio Nobel este año). Se trata de introducir en la célula un trozo de ARN de cadena doble, llamado 'ARN de interferencia pequeño', correspondiente a un segmento del gen a silenciar (Marano y Rakoczy, 2005). Cuando se detecta dentro de la célula la presencia del ARN de interferencia, se activa una serie de proteínas que destruyen todos los ARN (CD) de dicho gen. Los ARN de interferencia pequeños pueden diseñarse de forma que se eliminen específicamente los ARN mutantes y no los correctos. Hasta ahora se ha conseguido silenciar varios genes en la retina de roedores utilizando ARN de interferencia pequeños (Matsuda y Cepko, 2004), pero dada la novedad de esta estrategia, se requiere mejorar su eficiencia para que pueda ser utilizada como terapia en un futuro próximo (Tessitore y cols., 2006).

Para poder llevar a cabo terapia génica existen dos requisitos imprescindibles. En primer lugar, conocer el gen mutado en cada persona, mediante análisis genético, con el objeto de realizar una terapia diseñada adecuadamente para cada caso. En segundo lugar, que las células

sobre las que se va a realizar la terapia génica no hayan sufrido ya degeneración. No obstante, en los casos en que no se conozca el gen mutado concreto también podría realizarse terapia génica suministrándoles a las células de la retina el gen de un factor neurotrófico, cuya función sería la de proteger las neuronas frente a su degeneración progresiva y/o muerte (Farrar y cols., 2002). Con ello éstas producirían dicho factor de forma en principio ilimitada en el tiempo.

Las técnicas y estrategias expuestas en este artículo están en fase de experimentación en animales de laboratorio, y en algunos casos también en humanos, y muchas de ellas han demostrado ya ser capaces de retrasar en mayor o menor grado, o incluso revertir, los cambios patológicos en la retina causados por mutaciones hereditarias. Sin embargo, aunque los resultados obtenidos hasta hoy en animales modelo son muy prometedores, las investigaciones se encuentran aún en una fase relativamente precoz. Es preciso descubrir formas más eficaces de introducir genes normales en la retina y de que éstos funcionen durante un tiempo largo, o bien de silenciar los genes mutados de forma efectiva, según el caso. El perfeccionamiento de las técnicas de diagnóstico genético mediante 'chips de ADN' (González-Duarte, 2004), conjuntamente con la mejora de la eficacia de las técnicas de terapia génica, permitirá sin duda la curación total o parcial de numerosas formas de RP en el futuro.

BIBLIOGRAFÍA

- Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, Aleman TS, Cideciyan AV, Bennicelli J, Dejneka NS, Pearce-Kelling SE, Maguire AM, Palczewski K, Hauswirth WW y Jacobson SG (2005) Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Molecular Therapy* 12, 1072-1082.
- Ali RR, Sarra GM, Stephens C, Alwis MD, Bainbridge JW, Munro PM, Fauser S, Reichel MB, Kinnon C, Hunt DM, Bhattacharya SS y Thrasher AJ (2000) Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nature Genetics* 25, 306-310.
- Bejjani RA, BenEzra D, Cohen H, Rieger J, Andrieu C, Jeanny J-C, Gollomb G y Behar-Cohen FF (2005) Nanoparticles for gene delivery to retinal pigment epithelial cells. *Molecular Vision* 11, 124-132.
- Chong NHV y Bird AC (1999) Management of inherited outer retinal dystrophies: present and future. *British Journal of Ophthalmology* 83, 120-122.
- Cuenca N (2005) Utilización de neurotrofinas y células madre como posible opción terapéutica de la RP. *Visión* 26, 8-12.
- Farrar GJ, Kenna PF y Humphries P (2002) On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *EMBO Journal* 21, 857-864.
- González-Duarte R (2004) Un chip de ADN permitirá analizar todos los genes de retinosis conocidos en familias que tengan individuos afectados. *Visión* 25, 36-39.
- Hauswirth WW y Lewin AS (2000) Ribozyme uses in retinal gene therapy. *Progress in Retinal and Eye Research* 19, 689-710.
- Hauswirth WW, Li Q, Raisler B, Timmers AM, Berns KI, Flannery JG, LaVail MM y Lewin AS (2004) Range of retinal diseases potentially treatable by AAV-vectored gene therapy. *Novartis Foundation Symposium* 255, 179-188.
- Iborra FJ (2003) La terapia génica y la retinosis pigmentaria. *Visión* 23, 14-17.
- LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Drenser KA, Flannery JG, Lewin AS y Hauswirth WW (2000) Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: Long-term survival and late-stage therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97, 11488-11493.
- Liang FQ, Dejneka NS, Cohen DR, Krasnoperova NV, Lem J, Maguire AM, Dudus L, Fisher KJ y Bennett J (2001) AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. *Molecular Therapy* 3, 241-248.
- Marano RJ y Rakoczy PE (2005) Treatments for choroidal and retinal neovascularization: a focus on oligonucleotide therapy and delivery for the regulation of gene function. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 33, 81-89.
- Matsuda T y Cepko CL (2004) Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101, 16-22.
- Mayor Lorenzo, A. (2006) La terapia de células encapsuladas se probará en afectados por retinosis con buena visión durante 2006. *Retinosis.org – Actualidad* (http://www.retinosis.org/actualidad/060407_a.htm).
- McGee Sanftner LH, Abel H, Hauswirth WW y Flannery JG (2001) Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Molecular Therapy* 4, 622-629.
- RetNet (2006) Retinal Information Network (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>).
- Surace EM y Auricchio A (2003) Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer. *Progress in Retinal and Eye Research* 22, 705-719.
- Takahashi M (2004) Delivery of genes to the eye using lentiviral vectors. *Methods in Molecular Biology* 246, 439-449.
- Tessitore A, Parisi F, Denti MA, Allocca M, Di Vicino U, Domenici L, Bozzoni I y Auricchio A (2006) Preferential silencing of a common dominant rhodopsin mutation does not inhibit retinal degeneration in a transgenic model. *Molecular Therapy* 14, 692-699.
- Wang DY, Chan WM, Tam POS, Baum L, Lam DSC, Chong KKL, Fan BJ y Pang CP (2005) Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications. *Clinica Chimica Acta* 351, 5-16.
- Zhu C, Zhang Y y Pardridge WM (2002) Widespread expression of an exogenous gene in the eye after intravenous administration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 43, 3075-3080.